SHIMADZU APPLICATION NEWS
島津アプリケーションニュース
LAAN-A-SP006
●マイクロチップ電気泳動法
Microchip Electrophoresis
No.B27

MCE-202 “ MultiNA ” によるカビ・酵母遺伝子の検出

Detection of Molds and Yeast Gene with MCE-202“ MultiNA ”

カビや酵母は環境中や自然界のあらゆる場所に存在します。これらカビ・酵母は，みそ，チーズ，パン，ワイン，清酒などの食用として利用されるものから，われわれに病気を引き起こす原因となるものまで様々です。

近年，カビ・酵母などの真菌類を分子生物学的手法で検出する方法の一つとして，PCR（Polymerase Chain Reaction）法が利用されています。

通常，PCRを行う際は，カビ・酵母などの菌体（サンプル）からDNAを抽出する煩雑な前処理操作が必要となります。

ここでは，PCRの前処理操作をすることなく菌体から直接，PCR反応が可能となるPCR用試薬 “ Ampdirect® Plus ” とDNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置MCE-202 “ MultiNA ” を用いたカビ・酵母遺伝子の解析例をご紹介します。

T. Inagaki

■分析方法

Analytical Procedure

サンプルは，Table. 1に示すカビ（2種類），酵母（1種類）を用いました。*Eurotium*属は，乾物，パン，まんじゅうやジャムなど，やや乾燥した食品に発生するカビです。*Penicillium*属は，アオカビとも呼ばれ，柑橘類，穀物や乳製品などの多くの食品に発生するカビであり，食用としてチーズの製造に用いられるものから，カビ毒を発生する有害なものまで，種類は様々です。*Saccharomyces cerevisiae*は，出芽酵母であり，パン酵母，ワイン酵母，清酒酵母などがあります。

PCR反応試薬は，弊社の遺伝子増幅用試薬“ Ampdirect® Plus 酵素セット ” を使用し，PCR反応条件は付属の取扱説明書に準じました。

寒天培地に培養したカビ・酵母をマイクロピペットチップに付着させ，それをPCR反応液に懸濁し，PCRを行いました。（Fig. 1）

PCRは，ITS領域[(1)]を検出するプライマー（日本薬局方[(2)]記載の遺伝子解析による微生物の迅速同定法の真菌用ITSプライマー）を用いました。

PCR産物はMultiNAで分析しました。（Fig. 2）

Table 1　カビ・酵母サンプル
Molds and Yeast Samples

カビ：	*Eurotium chevalieri*
	Penicillium digitatum
酵母：	*Saccharomyces cerevisiae*

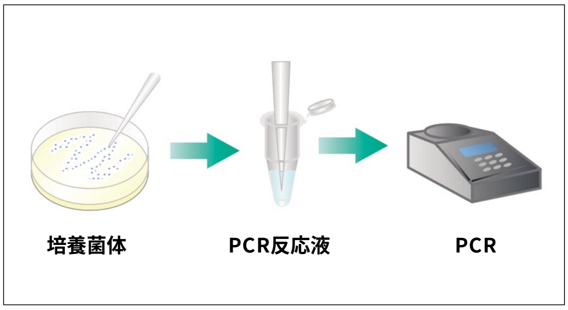


Fig. 1　ダイレクトPCR法
Method of Direct PCR

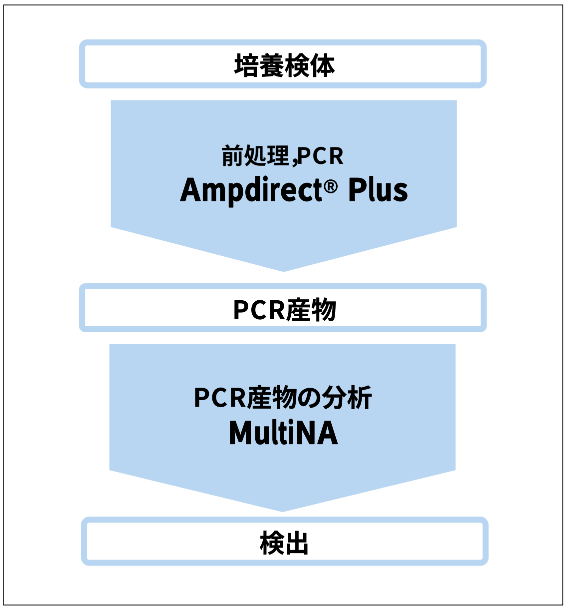


Fig. 2　カビ・酵母遺伝子の分析手順
Analytical Procedure of Molds and Yeast Gene

(1)ITS（Internal Transcribed Spacer）領域とは，リボソームRNA遺伝子（rDNA）の18 S，5.8 S，28 S，これら3つの間2ヶ所（18 Sと5.8 Sの間をITS1，5.8 Sと28 Sの間をITS 2）にある領域です。菌種間でこのITS領域の塩基配列に差があることが知られています。

(2)日本薬局方とは，医薬品の性状及び品質の適正を図るために定められた医薬品の規格基準書です。

■試薬 / キット
Reagents/Kits

- Ampdirect® Plus 酵素セット
  （島津製作所） P/N 241-08890-92
- DNA-500 キット
  （島津製作所） P/N 292-27910-91
- SYBR® Gold nucleic acid gel stain
  （インビトロジェン） S11494
- 25bp DNA ラダー
  （インビトロジェン） 10597-011

■PCR産物分析条件
Analytical Condition of PCR Products

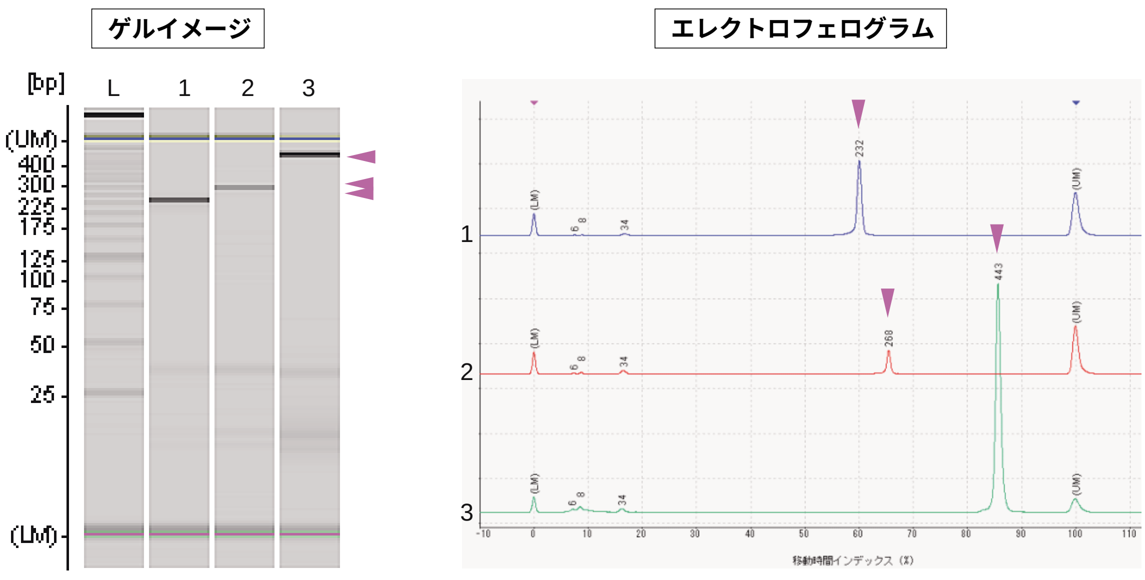
分析装置　：MCE-202 "MultiNA"
分析モード：DNA-500 プレミックスモード

■カビ・酵母遺伝子の検出
Detection of Molds and Yeast Gene

カビ・酵母遺伝子のITS領域をFig. 1，2の手順に従い分析した結果をFig. 3に示します。

カビ・酵母，それぞれに由来する遺伝子特異的増幅産物を明瞭に検出することができました。（図中エレクトロフェログラムのサイズ推定値は本実験によるものです。）

MultiNAでの測定結果は電気泳動ゲルイメージとエレクトロフェログラムとして得られます。また，増幅産物のサイズ推定値はサイズ既知の標準サンプル（Ladder）を基準として検量線を算定，濃度推定値は既知濃度の高分子量内部標準マーカ（Upper Marker）を基準として算出されます。そのため，ターゲットとする増幅産物の判定が，アガロースゲル電気泳動より，さらに確実，かつ容易となります。



L : Ladder Marker (25bp DNA Ladder)
1 : *Eurotium chevalieri* (Product Length 229bp)
2 : *Penicillium digitatum* (Product Length 261bp)
3 : *Saccharomyces cerevisiae* (Product Length 448bp)

Fig. 3　カビ・酵母遺伝子の分析結果
Analytical Results of Molds and Yeast Gene

初 版 発 行：2009年12月

島津製作所　分析計測事業部　応用技術部

島津分析コールセンター
● 0120-131691（携帯電話不可）
● 携帯電話専用番号（075）813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており,予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/
会員制Webの閲覧だけでなく,いろいろな情報サービスが受けられます。

3100-12901-580-IK
2009.12